

## QUALIDADE ÓSSEA DE RATAS WISTAR EM CRESCIMENTO ALIMENTADAS COM RAÇÃO HIPERLIPÍDICA

G. R. Yanagihara\*, R. C. Shimano\*, G.A. Gasparini\*, B. B. Brancalion\*, , A. C. O. Penoni\*, A. P. Macedo\*\*, J. M. R. S. Tavares\*\*\*A. C. Shimano\*

\*Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil

\*\*Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Departamento de Materiais Dentários e Próteses, Ribeirão Preto, Brasil

\*\*\*Instituto de Ciência e Inovação em Engenharia Mecânica e Engenharia Industrial, Departamento de Engenharia Mecânica, Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto, Porto, Portugal  
e-mail: gyanagihara@usp.br

**Resumo:** A relação entre a obesidade e o tecido ósseo permanece contraditória, mesmo após anos de investigações. Os resultados são inespecíficos, sobretudo, quando é avaliado o efeito de dietas ricas em gordura em modelos experimentais. O objetivo desse estudo foi avaliar a qualidade óssea de ratas wistar em crescimento alimentadas com ração hiperlipídica. Foram utilizadas 20 ratas pós-desmame. Elas foram divididas igualmente em dois grupos, sendo PAD: ratas alimentadas com ração padrão AIN-93 e HIP: ratas alimentadas com ração AIN-93 modificada de modo a conter 60% da energia em forma de gordura. O período de tratamento foi de 5 semanas. As ratas foram submetidas à eutanásia por doses excessivas de anestesia e, após necropsia e dissecação, as tíbias foram analisadas quando à Densidade Mineral Óssea (DMO), Resistência Mecânica e Análise microestrutural através da Microscopia Eletrônica de Varredura. A DMO foi estatisticamente maior no grupo HIP em relação ao grupo PAD, entretanto, a resistência mecânica foi estatisticamente igual entre os dois grupos. A microarquitetura permaneceu similar entre os dois grupos após análise quantitativa. Foi possível concluir, portanto, que embora a DMO tenha sido maior no grupo alimentado com ração hiperlipídica, a resistência mecânica e microarquitetura óssea permaneceu intacta após 5 semanas de tratamento.

**Palavras-chave:** Osso, Dieta Hiperlipídica, Resistência Mecânica

**Abstract:** *The relationship between obesity and bone tissue remains contradictory, even after years of investigation. The results are non-specific, particularly when it assessed the effect of high-fat diets in experimental models. The aim of this study was to evaluate bone quality of wistar growing rats fed with high-fat diet. 20 post-weaning wistars rats were used in this study. They were equally divided into two groups, PAD: rats fed with standard diet AIN-93 and HIP: rats fed with a modified AIN-93 diet to contain 60% of energy as fat. The exposure period was 5 weeks. The rats were euthanized by overdose of anesthesia and, after autopsy and dissection, tibiae were analyzed when*

*the Bone Mineral Density, Mechanical Strength and Microstructural Analysis by Scanning Electron Microscopy. BMD was statistically higher in the HIP group compared to the PAD group. However, the mechanical strength was statistically similar between the two groups. Microarchitecture remained similar between the two groups observed by quantitative analysis. It was concluded, therefore, that although BMD was higher in the group fed high-fat diet, the mechanical strength and bone microarchitecture remained intact after 5 weeks of exposure.*

**Keywords:** *Bone, High-fat diet, Mechanical Strength*

### Introdução

A mudança no padrão alimentar mundial gerou aumento no índice de obesidade desde a infância e, hoje, as complicações causadas por essa doença representam um grande impacto clínico e financeiro, afetando mais de 300 milhões de pessoas [1-3]. Por muito tempo, a obesidade foi vista como um fator protetor contra a osteoporose, podendo ser explicado por diversos fatores genéticos e mecânicos [1, 4]. Porém, após anos de pesquisas, a teoria que hoje prevalece é a de que a relação positiva entre a obesidade e osteoporose não existe [5-6]. Ou seja, por mecanismos compensatórios, a obesidade seria capaz de prejudicar o tecido ósseo, acelerando o processo de perda óssea natural do organismo [7-9].

No entanto, quando se associa a dieta hiperlipídica como modelo experimental para obesidade, muitos fatores podem influenciar nos resultados experimentais e por isso esses resultados ainda são controversos.

Os estudos com animais em crescimento se tornam necessários devido aos relatos conflitantes entre o aumento da massa gorda e Índice de massa corpórea (IMC) sobre os riscos de fraturas na infância. Foi observado que crianças obesas poderiam ter um pico de massa óssea mais acelerado, o que muitas vezes poderia fornecer vantagens na proteção do osso no momento de declínio de massa em função da idade. Entretanto, esses dados ainda não são confirmados, o que gera a necessidade dos estudos experimentais [10].

O objetivo desse estudo foi avaliar a qualidade óssea de ratas em crescimento alimentadas com ração hiperlipídica.

### Materiais e métodos

O estudo foi, primeiramente, aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo (FMRP/USP): 188/2013.

**Grupos Experimentais** – Foram utilizadas 20 fêmeas *Rattus Norvegicus Albinus*, da variedade Wistar, solicitadas pós-desmame (3 semanas de idade). Elas permaneceram durante todo o experimento em ambiente calmo com condições controladas, e foram divididas igualmente em 2 grupos experimentais (n=10): PAD: Ratas alimentadas com ração padrão AIN-93 e HIP: Ratas alimentadas com ração hiperlipídica (AIN-93 modificada, 60% da energia em forma de gordura saturada).

O período experimental foi de 5 semanas. A ração e água foram fornecidas *ad libitum*.

**Eutanásia** – Após o período experimental, as ratas foram mortas por excesso de anestesia (combinação de Ketamina e Xilazina) e as tíbias foram extraídas dos segmentos corporais e dissecadas para, posteriormente, serem analisadas. A escolha dessa estrutura óssea foi feita por ser uma estrutura anatômica que permitisse o corte transversal para análise microestrutural de forma a não perder informações importantes.

**Densitometria Óssea** – A análise da DMO foi realizada no Densitômetro de absormetria de raios-x de dupla energia (DXA), Lunar®, modelo DPX-IQ. O cálculo da DMO foi realizado pelo software DPX versão 4.7e, especial para pequenos animais. A área da região de análise (ROI) foi padronizada em 0,09cm<sup>2</sup> e realizada sempre na região proximal da tíbia, abaixo da cartilagem de crescimento, por ser uma região com grande quantidade de osso trabecular.

**Análise Mecânica** – Os ensaios mecânicos de flexão em 3 pontos das tíbias foram realizados na Máquina Universal de Ensaio, EMIC®, modelo DL10.000. A distância entre os 2 pontos foi padronizada em 25mm e a velocidade de aplicação de força foi de 1,0mm/min. A força foi aplicada no sentido pósterio-anterior da tíbia. Foi utilizada uma pré-carga de 5N e tempo de acomodação de 30s. As propriedades mecânicas avaliadas foram a Força Máxima (N) e a Rigidez Relativa (N/mm).

**Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)** – Para análise por MEV os ossos passaram por desidratação em álcool 99% durante 7 dias. Posteriormente foram cortados em plano coronal em uma serra de precisão, com cortes padronizados em 1,7mm. Os cortes foram submetidos a um banho utilizando ultrassom por 10 minutos para expelir qualquer resíduo no material. Posteriormente, os cortes foram fixados em porta-amostras, mantidos em desumidificação, e após secos, foram metalizados em ouro 24K na metalizadora Ted Pella®, modelo 108 20

VAC. Posteriormente, as amostras foram inseridas no Microscópio Eletrônico de Varredura, Zeiss®, modelo Evo-MA10e as imagens foram adquiridas com aumento de 200 vezes.

A quantificação das imagens obtidas por MEV foi feita através do programa de computador QI-MEV [11], criado e patenteado pelos autores desse trabalho. Esse programa é capaz de criar um modelo tridimensional através de uma imagem bidimensional utilizando a tonalidade de cinza como padrão de profundidade da imagem (Fig. 2). Desse modo, é possível calcular a área de superfície expressa em píxel. O ROI de análise foi padronizado em todas as imagens.

**Análise estatística** – A análise estatística foi realizada através do programa SPSS, IBM®, versão 20.0. O teste de Shapiro-Wilk foi aplicado para testar a normalidade dos dados. A comparação entre o grupo PAD e HIP foi feita através do teste *T-student*. Foi considerado resultado significativo quando  $p < 0,05$  e os dados apresentados em média±desvio padrão.

### Resultados

A Figura 1 apresenta os resultados obtidos. A DMO do grupo HIP foi 18,26% maior do que a do grupo PAD ( $p=0,02$ ). A análise mecânica mostrou não haver diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, tanto para a Força Máxima como para a Rigidez Relativa.

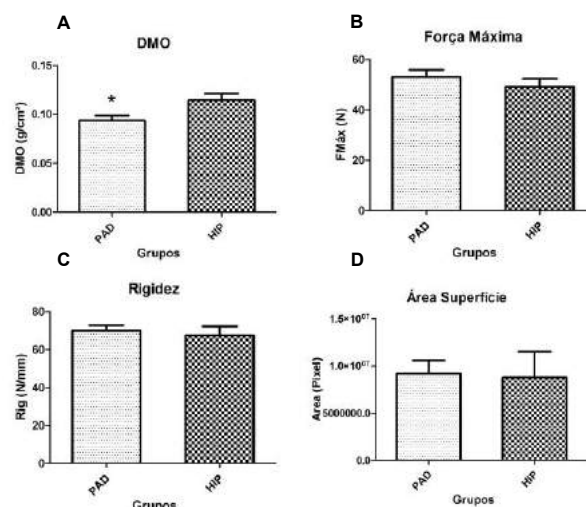


Figura 1: Gráficos dos resultados de A) DMO, B) Força Máxima, C) Rigidez Relativa e D) área de superfície.

A Figura 2 ilustra os modelos tridimensionais reconstruídos a partir do programa Qi-MEV. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos com relação à área de superfície avaliada nas imagens obtidas por MEV (Figura 1D).

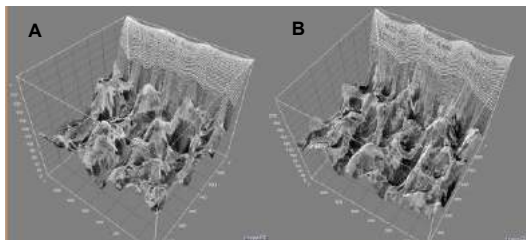


Figura 2: Reconstrução do modelo 3D das imagens obtidas pelo MEV, sendo A) imagem óssea do grupo PAD e B) imagem óssea do grupo HIP.

## Discussão

Neste estudo foram avaliadas características estruturais, microestruturais e mecânicas de ossos de ratas em crescimento alimentadas com dieta hiperlipídica. Os resultados demonstram uma influência positiva dessa dieta na DMO, porém sem afetar a microarquitetura e propriedades mecânicas avaliadas.

Por muito tempo a obesidade foi considerada benéfica para os ossos. O efeito positivo do aumento do IMC sobre a massa óssea era explicado basicamente pelo fato do peso corporal aumentar a sobrecarga mecânica nos ossos, fator crucial para o estímulo à formação óssea [12-14]. Além disso, estudos mostraram que a massa gorda e a massa óssea estão sob forte regulação genética [12], pois os osteoblastos e adipócitos dividem os mesmos precursores de células-tronco mesenquimais. Porém, recentemente essa teoria foi contestada e diversos grupos de pesquisa passaram a confirmar cientificamente que o risco de desenvolvimento da osteopenia e osteoporose, bem como de fraturas associadas à baixa massa óssea pode ser maior em indivíduos obesos [6, 15]. Entretanto, nota-se que existe uma escassez de estudos que enfoquem essa relação sobre crianças e adolescentes.

O presente estudo abordou ossos de ratas em crescimento dado ao alto índice de obesidade infantil. Estimativas da Organização Mundial de Saúde indicam que mais de 42 milhões de crianças estão em condições de sobrepeso e obesidade. Além disso, o pico de massa óssea aumentado é fator determinante na qualidade óssea tardia [10].

Alguns estudos mostraram que o Conteúdo Mineral Ósseo (CMO) em crianças obesas é maior do que crianças eutróficas, mas a DMO de fêmur e coluna e o risco de fraturas não se alteram em função do aumento de massa gorda [16-17]. Nosso estudo corrobora com os achados na literatura, pois, embora tenhamos encontrado aumento na DMO de tíbias de ratas alimentadas com ração hiperlipídica, a microarquitetura e resistência mecânica desses ossos não mostraram diferenças estatisticamente significantes.

Os resultados de estudos experimentais, muitas vezes, não podem ser totalmente extrapolados para humanos. Apesar disso, os estudos em animais são justificados, pois, clinicamente a avaliação funcional do osso não consegue explorar mínimas alterações estruturais. Desse modo, os estudos experimentais são

necessários, pois com eles é possível uma avaliação detalhada desse sistema.

Este estudo proporciona novas perspectivas sobre a relação entre alterações metabólicas induzidas pela obesidade, especialmente aquelas que se relacionam com a função e qualidade óssea infantil. Enquanto os estudos futuros são necessários para compreender melhor possíveis alterações tardias nos ossos, os resultados aqui apresentados sugerem que, embora haja um aumento na DMO em resposta a dieta hiperlipídica, essa dieta não exerce influência sobre a qualidade e a função dos ossos.

## Conclusão

A alimentação hiperlipídica parece não influenciar na qualidade óssea da tíbia de ratas em crescimento. Ainda que a DMO esteja aumentada, a microarquitetura e resistência óssea permanecem intactas após 5 semanas de tratamento.

## Agradecimentos

Agradecimento à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento desse estudo.

## Referências

- [1] Silva HG, Mendonça LM, Conceicao FL, Zahar SE, Farias ML. Influence of obesity on bone density in postmenopausal women. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2007; 51:943-949.
- [2] Pereira LO, Francischi RPD, Lancha Jr AH. Obesidade: Hábitos Nutricionais, Sedentarismo e Resistência à Insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2003; 47.
- [3] Pinheiro MM, Schuch NJ, Genaro PS, Ciconelli RM, Ferraz MB, Martini LA. Nutrient intakes related to osteoporotic fractures in men and women--the Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS). *Nutr J*. 2009; 8:6.
- [4] Bandeira F. A Obesidade Realmente Fortalece os Ossos? *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo*. 2007; 51:3
- [5] Azevedo GD, Carvalho MND, Azevedo J, Fortunato GdG, Ferriani RA, Sá MFSd. Serum leptin levels and bone mineral density in postmenopausal women. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet*. 2004; 26:429-433.
- [6] Looker AC, Flegal KM, Melton LJ, 3rd. Impact of increased overweight on the projected prevalence of osteoporosis in older women. *Osteoporos Int*. 2007; 18:307-313.
- [7] Zhao LJ, Liu YJ, Liu PY, Hamilton J, Recker RR, Deng HW. Relationship of obesity with osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; 92:1640-1646.

- [8] Morais GQ, Burgos MGPdA. Impacto dos nutrientes na saúde óssea: novas tendências. *Revista Brasileira de Ortopedia*. 2007; 42:189-194.
- [9] Hsu YH, Venners SA, Terwedow HA, Feng Y, Niu T, Li Z, Laird N, Brain JD, Cummings SR, Bouxsein ML, Rosen CJ, Xu X. Relation of body composition, fat mass, and serum lipids to osteoporotic fractures and bone mineral density in Chinese men and women. *Am J Clin Nutr*. 2006; 83:146-154.
- [10] Leonard MB, Shults J, Wilson BA, Tershakovec AM, Zemel BS. Obesity during childhood and adolescence augments bone mass and bone dimensions. *Am J Clin Nutr*. 2004; 80:514-523.
- [11] Gasparini, GA, Yanagihara GR, Shimano AC. Qi-MEV: Quantificação da Imagem de Microscopia Eletrônica de Varredura. BR n. RPI 000255-7, 2 abr. 1980. *Revista de Propriedade Industrial*, n.253, p.1-15348, 2016.
- [12] Nguyen TV, Howard GM, Kelly PJ, Eisman JA (1998) Bone mass, lean mass, and fat mass: same genes or same environments? *Am J Epidemiol*. 1998; 147:3-16
- [13] De Laet C, Kanis JA, Oden A, Johanson H, Johnell O, Delmas P, Eisman JA, Kroger H, Fujiwara S, Garnero P, McCloskey EV, Mellstrom D, Melton LJ, 3rd, Meunier PJ, Pols HA, Reeve J, Silman A, Tenenhouse A. Body mass index as a predictor of fracture risk: a meta-analysis. *Osteoporos Int*. 2005; 16:1330-1338.
- [14] Ravn P, Cizza G, Bjarnason NH, Thompson D, Daley M, Wasnich RD, McClung M, Hosking D, Yates AJ, Christiansen C. Low body mass index is an important risk factor for low bone mass and increased bone loss in early postmenopausal women. Early Postmenopausal Intervention Cohort (EPIC) study group. *J Bone Miner Res*. 1999; 14:1622-1627.
- [15] Lenchik L, Register TC, Hsu FC, Lohman K, Nicklas BJ, Freedman BI, Langefeld CD, Carr JJ, Bowden DW. Adiponectin as a novel determinant of bone mineral density and visceral fat. *Bone*. 2003; 33:646-651.
- [16] Fischer S, Milinarsky A, Giadrosich V, Dib G, Arriagada M, Arinoviche R. X-ray absorptiometry of bone in obese and eutrophic children from Valparaiso, Chile. *J Rheumatol*. 2000; 27:1294-1296.
- [17] Hasanoglu A, Bideci A, Cinaz P, Tumer L, Unal S. Bone mineral density in childhood obesity. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2000; 13:307-311.